

# 三七药材中微生物污染的研究

白雯静\*, 李志俊, 周 斌, 徐雪梅, 袁顺捷

(兰州市食品药品检验检测研究院, 兰州 730050)

**摘 要:** **目的** 分析和研究三七药材微生物污染情况, 探讨三七药材微生物污染的主要种类。**方法** 参照2015年版《中国药典》四部通则 1105、1106 的方法, 并结合传统生化和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对纯化的菌落进行鉴定。最后, 运用 SPSS 18.0 软件对数据进行进一步地统计和分析。**结果** 三七药材样品在经过 100 °C、30 min 热处理后, 需氧菌总数呈现明显下降趋势, 芽孢杆菌属、水生拉恩菌为三七药材污染概率较高的菌。**结论** 在三七药材灭菌工艺的考察中, 应该着重杀灭芽孢杆菌, 为确保安全和药效, 需要结合多种灭菌方法。**关键词:** 三七; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 微生物污染

## Study on microbial contamination of *Panax notoginseng*

BAI Wen-Jing\*, LI Zhi-Jun, ZHOU bin, XU Xue-Mei, YUAN Shun-Jie

(Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze and investigate the microbial pollution of *Panax notoginseng*, and discuss the main types of microbial pollution of *Panax notoginseng*. **Methods** According to the method of Chinese Pharmacopoeia (2015 edition), the purified colony was identified by combining traditional biochemistry method and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Finally, SPSS 18.0 software was used for further statistics and analysis of the data. **Results** After heat treatment at 100 °C for 30 min, the total number of aerobic bacteria in *Panax notoginseng* samples showed a significant downward trend, and *Bacillus* and *Aquatic ranella* were the bacteria with higher pollution probability. **Conclusions** In the investigation of the sterilization process of *Panax notoginseng*, *Bacillus* should be killed emphatically by combining a variety of sterilization methods, in order to ensure the safety and efficacy.

**KEY WORDS:** *Panax notoginseng*; matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; microbial contamination

## 0 引 言

三七, 为五加科植物三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>。三七的传统功效为止血、散瘀、

消肿、止痛、补虚等, 现代药理研究发现三七在免疫系统、心血管系统、神经系统、抗肿瘤、抗衰老等方面同样具有药理活性<sup>[2]</sup>。通过对近年来中药材及饮片的微生物污染情况相关文献进行整理和研究发现: 我国中药材以及饮片微

基金项目: 甘肃省药品产业技术扶持项目(2019KF006)

Fund: Supported by the Drug Administration of Gansu Province (2019KF006)

\*通信作者: 白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品微生物检验。E-mail: yd08joy@163.com

\*Corresponding author: BAI Wen-Jing, Master, Pharmacist, Lanzhou Institute for Food and Drug Control, No.988, Pengjiaping Town, Qilihe District, Lanzhou 730050, China. E-mail: yd08joy@163.com

生物污染情况较为严重<sup>[3-9]</sup>。三七,作为根类饮片的一种:其根茎长期在土壤中,而且其药材表面的褶皱多而深。另一方面,三七药材加工为饮片的方法十分简单:“取三七,洗净,干燥,碾成细粉”<sup>[1]</sup>。因此,在三七药材的加工过程很难清除微生物的污染。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱法。CHERKAOUI 等<sup>[10]</sup>通过实验证实 MALDI-TOF-MS 是一种适用于细菌菌种鉴定的方法。另一方面, MALDI-TOF-MS 由于它的准确性和时效性,同时也被作为酵母菌鉴定的一种主要方法<sup>[11-12]</sup>。本研究通过结合传统生化方法与 MALDI-TOF-MS 仪器相结合,对大批量纯化菌落进行鉴定和分析,以期对三七药材灭菌工艺的研究提供有力数据和理论支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 品

3 批三七样品的来源与编号如下表 1 所示,所有样品均由兰州市食品药品监督管理局中药室人员进行鉴别。

表 1 药材来源及编号信息

Table 1 Source and serial information of medicinal materials

三七产地	样品编号
文山州文山县	SQ-1
文山州马关县	SQ-2
文山州砚山县	SQ-3

### 1.2 仪器与材料

AC2-6S1 型 ESCO 生物安全柜(新加坡艺思高公司); GR-85 致微高压灭菌器(厦门致微公司); IN 750 plus 型恒温培养箱(德国美墨尔特公司); MALDI-Biotyper 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(美国布鲁克公司)。

胰酪大豆胨液体培养基、RV 沙门菌增菌液体培养基、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基、pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基(北京陆桥股份有限公司);金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*[CMCC (B) 26 003]、大肠埃希菌 *Escherichia coli*[CMCC(B) 44 102]、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*[CMCC(B) 63 501]、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*[CMCC(B) 10 104]、白色念珠菌 *Candida albicans*[CMCC(F) 98 001]、黑曲霉 *Aspergillus niger*[CMCC(F) 98 003]均购买于中国食品药品检定研究

院,并定期采用国标的鉴定方法进行鉴定和确认。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 供试品溶液的制备

将药材(饮片)样品以无菌操作打粉,取打粉后的药材 25 g,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液按照 1:10(V:V)进行稀释,充分混匀后吸取上清液,作为供试液。

#### 1.3.2 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的检查

取“1.3.1”项下的供试液,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液分别稀释至 1:100、1:1000、1:10000、1:100000(V:V)。按照 2020 年版《中国药典》<sup>[13]</sup>四部通则 1105 进行需氧菌总数(the aerobic plate count, TAMC)、霉菌和酵母菌总数(the mold and yeast calculate, TYMC)的测定。

#### 1.3.3 耐热菌数的检查

将药材样品以无菌操作打粉,取打粉后的药材 25 g,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液按照 1:10(V:V)进行稀释,于沸水浴(100 °C)热处理 30 min,充分混匀后吸取上清液,作为供试液。按照 1.3.2 项下需氧菌总数(TAMC)的方法进行耐热菌数的测定。

#### 1.3.4 控制菌的检查

取 1.3.1 项下的供试液,按照 2020 年版《中国药典》<sup>[13]</sup>四部通则 1108 项下的方法分别进行耐胆盐革兰阴性菌(定性实验)、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和沙门菌实验。

#### 1.3.5 分离和鉴定

对 1.3.2 ~ 1.3.4 项下所有平板上培养出来的菌落根据大小和形态分别进行挑取和纯化培养(TSA 培养基平板),并用 MALDI-TOF-MS 进行进一步地鉴定和分析。根据仪器要求:打分值在 2.300 ~ 3.000 为“完全可靠地鉴定到种的水平”;打分值在“2.000 ~ 2.299”为“可靠鉴定到属的水平,有可能鉴定到种的水平”;打分值在“1.700 ~ 1.999”为“有可能鉴定到属的水平”。为保证鉴定结果的准确性,后文所列鉴定结果相应打分值均在 2.000 以上。

#### 1.3.6 数据处理

采用 SPSS 18.0 软件对所有相关数据进行统计和分析(计数资料采用描述性分析方法)。

## 2 结果与分析

### 2.1 三七样品的 lgTAMC、TYMC、lgTYMC、NAIRE 检查结果

由表 2、3 可知:3 批三七样品中需氧菌总数计数结果普遍较高,样品编号 SQ-1、SQ-3 霉菌和酵母菌计数结果较高,经 100 °C、30 min 热处理后再进行霉菌和酵母菌计数,发现平板基本无菌落生长。因此,热处理后计数的耐热菌的研究比较有意义。

表 2 TAMC、lgTAMC、NAIRE、lgNAIRE 的结果  
Table 2 Results of TAMC, lgTAMC, NAIRE and lgNAIRE

样品编号	TAMC/(CFU/g)	lgTAMC	NAIRE/(CFU/g)	lg NAIRE
SQ-1	$7.2 \times 10^2$	2.86	95	1.98
SQ-2	$1.6 \times 10^2$	2.22	25	1.40
SQ-3	$5.4 \times 10^2$	2.74	25	1.40

表 3 TYMC、lgTYMC 的结果  
Table 3 Results of TYMC and lgTYMC

样品编号	TYMC/(CFU/g)	lgTYMC
SQ-1	$6.2 \times 10^2$	2.80
SQ-2	20	1.30
SQ-3	$1.6 \times 10^2$	2.19

### 2.2 三七样品经 100 °C、30 min 热处理后 lgTAMC 下降百分比结果

由表 4 和图 1 可知: 三七药材经 100 °C、30 min 热处理后, lgTAMC 数值呈现下降趋势(数值集中在 60%±10% 的范围内), 由此提示三七药材中耐热菌的数量可能在 50% 左右。综合上述结果, 在常规药材的使用过程中都需要加水进行进一步地煎煮, 煎煮的过程一般都会持续半个小时左右, 此时霉菌和酵母菌可能不再成为一个较大的风险点。反之, 耐热菌由于抗热的特性, 会对药材的微生物污染风险起到较大的影响。

表 4 100 °C、30 min 热处理后 lgTAMC 的下降值  
Table 4 Decline of lgTAMC after treated at 100 °C for 30 min

样品编号	100 °C、30 min 热处理后 lgTAMC 下降百分比/%
SQ-1	69.2
SQ-2	63.1
SQ-3	51.1
均值	61.13
标准差	9.209

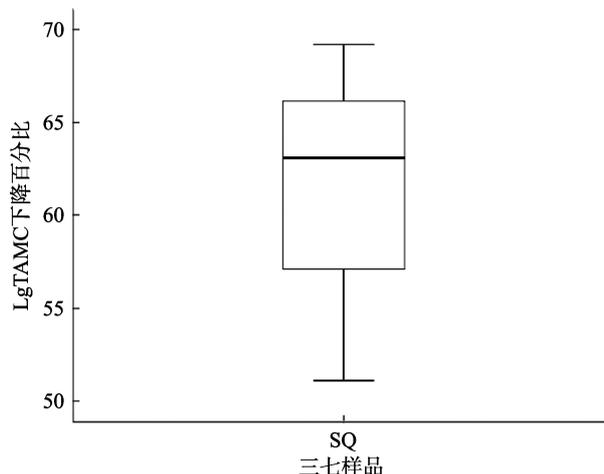


图 1 经过 100 °C、30 min 热处理后 lgTAMC 下降百分比  
Fig.1 Percentage of lgTAMC decline after treated at 100 °C for 30 min

### 2.3 三七样品 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

对所有纯化菌种使用 MALDI-TOF-MS, 参照仪器方法进行鉴定分析, 结果见下表 5, 发现三七样品中芽孢杆菌所占比例较高。

### 2.4 三七药材中纯化菌落革兰氏染色结果

对分离纯化菌落后的分别进行革兰氏染色(如表 6), 其染色结果显示与 MALDI-Biotyper 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪鉴定结果对应的革兰氏染色相一致, 从一定程度上也证明了 MALDI-TOF-MS 菌种种属鉴定的可信性。

表 5 MALDI-TOF-MS 鉴定结果  
Table 5 Identification results of the MALDI-TOF-MS

样品编号	MALDI-TOF-MS 鉴定结果
SQ-1	<i>Bacillus licheniformis</i> 地衣芽孢杆菌、 <i>Bacillus sp</i> 芽孢杆菌属、 <i>Bacillus subtilis</i> 枯草芽孢杆菌、 <i>Virgibacillus proomii</i> 普鲁氏枝芽孢杆菌
SQ-2	<i>Bacillus licheniformis</i> 地衣芽孢杆菌、 <i>Bacillus weihenstephanensis</i> 魏汉斯特范芽孢杆菌、 <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> 嗜冷芽孢杆菌
SQ-3	<i>Bacillus megaterium</i> 巨大芽孢杆菌、 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 解淀粉芽孢杆菌、 <i>Rahnella aquatilis</i> 水生拉恩菌

表 6 革兰氏染色结果  
Table 6 Results of gram stain

菌种名称	革兰氏染色结果
<i>Bacillus licheniformis</i> 地衣芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Bacillus</i> sp 芽孢杆菌属	革兰氏阳性
<i>Bacillus subtilis</i> 枯草芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Virgibacillus proomii</i> 普鲁氏枝芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 魏汉斯特范芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> 嗜冷芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Bacillus megaterium</i> 巨大芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 解淀粉芽孢杆菌	革兰氏阳性
<i>Rahnella aquatilis</i> 水生拉恩菌	革兰氏阴性

### 3 结论与讨论

由于本研究涉及到的实验仅选自 3 批三七药材(购买于云南省文山州 3 个不同的县区), 其结果具有一定的局限性, 因此, 相关结果仅针对以上 3 个批次。后期的研究会在此基础上增加样品批数以及产地, 从而提供更多数据支撑。3 批选自不同产地的三七药材在经过 100 °C、30 min 热处理后需氧菌总数的下降百分比十分接近, 这种现象提示可能与药材本身的特点有关。经过进一步地鉴定, 主要涉及到的污染菌多为芽孢杆菌, 而芽孢杆菌多为好氧或兼性厌氧菌, 易产生内生芽孢, 其对不利环境有较强抵抗力<sup>[14]</sup>。因此较难消除, 而且一旦生长的不利因素被排除, 内生孢子又会迅速变为营养体, 进一步地大量增殖, 从而影响到中药材的质量和疗效。

生产加工企业在进行中药材加工时, 如果消杀工艺不彻底或者采用的方法不“对症”, 往往会出现消杀后中药材的微生物相关指标比原药材呈现大幅度增长的情况。基于芽孢这一特殊的存在, 因此在后期三七灭菌工艺的研究中, 需要集中关注此类微生物的消杀。同时, 还要考虑到, 彻底的高温消杀可能会影响到三七中人生皂苷 Rg1、人参皂苷 RB1 以及三七皂苷 R1 的含量, 还可能会引起三七药材整个疗效的改变。因此, 方法的选择必须十分慎重, 最好能结合多种灭菌方法同时进行操作。

另外, 与传统生化鉴定的方法相比较, MALDI-TOF-MS 可以大幅度节约时间, 提高检验效率。尤其是当需要对多个生物样本同时进行鉴定的时候, 可以在较短时间内完成大量数据的积累。因此, 可以尝试运用到其他中药材微生物污染菌的鉴定和筛选中。

#### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

- State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China: Volume I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [2] 杨娟, 袁一征, 尉广飞, 等. 三七植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(10): 1641-1647.  
YANG J, YUAN YIZ, WEI GF, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Panax notoginseng* [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2017, 19(10): 1641-1647.
- [3] 江珍玉, 陈纯纯, 龚勇祥, 等. 5 种常见根类中药饮片微生物污染相关因素分析研究 [J]. 中药材, 2018, 41(7): 1593-1597.  
JIANG ZY, CHEN CC, GONG YX, *et al.* Analysis of related factors of microbial contamination in five common root Chinese herbal pieces [J]. Chin Herb Med, 2018, 41(7): 1593-1597.
- [4] 刘洪祥, 曹晓云. 中药饮片中需氧菌、霉菌和酵母菌污染情况的研究及分析 [J]. 天津药学, 2017, 29(1): 9-14.  
LIU HX, CAO XY. Study and Analysis on the contamination of aerobic bacteria, mold and yeast in Chinese herbal pieces [J]. Tianjin Pharm, 2017, 29(1): 9-14.
- [5] 邓彦, 王娅珂, 韩晓宇, 等. 不同品种根类中药饮片耐胆盐革兰阴性菌污染研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4135-4141.  
DENG Y, WANG YK, HAN XY, *et al.* Study on bile salt resistant gram negative bacteria contamination of different kinds of root Chinese herbal pieces [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2017, 42(21): 4135-4141.
- [6] 张光华, 王似锦, 江志杰, 等. 北京地区销售的 10 种中药饮片微生物污染程度考察 [J]. 中国药房, 2018, 29(14): 1940-1944.  
ZHANG GH, WANG SJ, JIANG ZJ, *et al.* Investigation of microbial contamination for 10 kinds of TCM decoction pieces in Beijing area [J]. Chin Pharm, 2018, 29(14): 1940-1944.
- [7] 杨晓莉, 李辉, 绳金房. 12 种中药饮片耐热菌污染状况调查及风险评估 [J]. 陕西中医, 2016, 37(6): 740-743.  
YANG XL, LI H, SHENG JF. 12 Kinds of Chinese herbal medicine thermophilic bacteria contamination investigation and risk assessment [J]. Shanxi J Tradit Chin Med, 2016, 37(6): 740-743.
- [8] 绳金房, 杨晓莉, 李辉. 陕西省 12 种中药饮片微生物污染调查及风险评估 [J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 608-612.  
SHENG JF, YANG XL, LI H. Investigation and risk assessment of 12 kinds of Chinese herbal medicines microbial contamination in Shaanxi

- province [J]. Northwest Pharm J, 2016, 31(6): 608-612.
- [9] 甘永琦, 农浚, 零文超, 等. 广西等地区 9 种中药饮片微生物污染状况分析[J]. 中国药师, 2018, 21(5): 922-927.
- GANG YQ, NONG L, LING WC, *et al.* Analysis of microbial contamination status of 9 kinds of Chinese herbal pieces from Guangxi regions [J]. Chin Pharm, 2018, 21(5): 922-927.
- [10] CHERKAOUI A, HIBBS J, EMONET S, *et al.* Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48, 1169-1175.
- [11] MARKLEIN G, JOSTEN M, KLANKE U, *et al.* Matrix assisted laser desorption ionization-time offlight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47: 2912-2917.
- [12] PAN YL, CHOW NH, CHANG TC, *et al.* Identification of lethal *Aspergillus* at early growth stages based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70: 344-354.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume IV [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [14] 刘仁杰, 梁珊, 李哲, 等. 杀灭芽孢杆菌的方法及机理的研究综述[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 257-261.
- LIU RJ, LIANG S, LI Z, *et al.* A review of the methods and mechanisms of killing *Bacillus* [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45 (13): 257-261.

(责任编辑: 于梦娇)

### 作者简介



白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品微生物检验。  
E-mail: yd08joy@163.com